

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2003-102498
(P2003-102498A)

(43)公開日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 1/02		A 0 1 H 1/02	Z 4 B 0 6 3
1/08		1/08	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
33/566		33/566	
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)			

(21)出願番号 特願2001-304226(P2001-304226)

(22)出願日 平成13年9月28日(2001.9.28)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成13年3月30日
日本育種学会発行の「育種学研究 第3巻別冊1号」に
発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 辻本 壽

神奈川県横浜市戸塚区舞岡町641-12 横
浜市立大学木原生物学研究所内

(72)発明者 持田 恵一

神奈川県横浜市戸塚区舞岡町641-12 横
浜市立大学木原生物学研究所内

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 染色体解析方法

(57)【要約】

【課題】生体での形態を保持した状態で染色体の動態を
解析することが可能な染色体解析方法を提供すること。

【解決手段】分析対象の雑種の植物個体由来の試料と、
該試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液とを
接触させて、該試料を固定し、固定試料を得、該固定試
料内に、該雑種の植物個体にゲノムを提供していること
が疑われる分析種由来の核酸を標識物質で標識した標識
プローブが浸透されうる条件下、かつ、該標識プローブ
と、該試料中に存在し、該プローブの配列に相補的な配
列を有する核酸とが特異的にアニーリングするに適した
条件下に、該標識プローブと該固定試料とのハイブリダ
イゼーションを行ない、試料における染色体の動態を前
記標識プローブのそれぞれの標識物質に由来するシグナ
ルを介して観察する染色体解析方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 分析対象の雑種の植物個体由来の試料と、該試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液とを接触させることにより、該試料を固定して、固定試料を得るステップ、(b) 前記ステップ(a)で得られた固定試料内に、該雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種由来の核酸を標識物質により標識して得られた標識プローブが浸透されうる条件下、かつ、該標識プローブと、該試料中に存在する核酸とが特異的にアニーリングするに適した条件下に、前記標識プローブと前記ステップ(a)で得られた固定試料とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、及び(c) 試料における染色体の動態を前記標識プローブのそれぞれの標識物質に由来するシグナルを介して観察するステップを含む、染色体解析方法。

【請求項2】 分析対象の雑種の植物個体由来の試料が、雑種胚である、請求項1記載の染色体解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、染色体解析方法に関する。さらに詳しくは、植物の染色体の動態を解析しうる、染色体解析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、有用な植物の育種に対する様々な試みがなされている。例えば、コムギとトウモロコシとの交雑などが行なわれている。

【0003】コムギにトウモロコシ花粉を交雑すると、花粉管が伸長し、トウモロコシの精核は、コムギの卵と受精する。

【0004】しかしながら、トウモロコシ染色体は、胚発生の初期に脱落し、コムギ半数体が生じる。そのため、この遠縁交雑によりトウモロコシの変異をコムギ内で利用することは実現していないのが現状である。トウモロコシ染色体が脱落する原因を探るべくその脱落過程を調査することは、この交雑不和合性を打破するために重要である。

【0005】コムギ×トウモロコシ雑種胚からのトウモロコシ染色体の脱落は、ローリーとベンネット(Laurie and Bennett) [Genome, 32:953-961 (1989)]により観察され、脱落の時期が決定されている。しかしながら、前記ローリーらの知見は、押しつぶし法による観察であるため、染色体の空間的な配置、間期核における動態などの情報を得ることが困難であるのが現状である。したがって、両種染色体の位置関係等については不明であるのが現状である。

【0006】したがって、生体における状態に近い状態、すなわち保存性の高い状態で染色体を、特に、異種染色体を特異的に染色・識別し、観察しうる技術が求められている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、生体における形態を保持した状態、すなわち保存性の高い状態で染色体の動態を解析することが可能な染色体解析方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の要旨は、(1)

(a) 分析対象の雑種の植物個体由来の試料と、該試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液とを接触させることにより、該試料を固定して、固定試料を得るステップ、(b) 前記ステップ(a)で得られた固定試料内に、該雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種由来の核酸を標識物質により標識して得られた標識プローブが浸透されうる条件下、かつ、該標識プローブと、該試料中に存在する核酸とが特異的にアニーリングするに適した条件下に、前記2標識プローブと前記ステップ(a)で得られた固定試料とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、及び(c) 試料における染色体の動態を前記標識プローブのそれぞれの標識物質に由来するシグナルを介して観察するステップを含む、染色体解析方法、並びに(2) 分析対象の雑種の植物個体由来の試料が、雑種胚である、請求項1記載の染色体解析方法、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の染色体解析方法は、

(a) 分析対象の雑種の植物個体由来の試料と、該試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液とを接触させることにより、該試料を固定して、固定試料を得るステップ、(b) 前記ステップ(a)で得られた固定試料内に、該雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種由来の核酸を標識物質により標識して得られた標識プローブが浸透されうる条件下、かつ、該標識プローブと、該試料中に存在する核酸とが特異的にアニーリングするに適した条件下に、前記2標識プローブと前記ステップ(a)で得られた固定試料とのハイブリダイゼーションを行なうステップ、及び(c) 試料における染色体の動態を前記標識プローブのそれぞれの標識物質に由来するシグナルを介して観察するステップを含むことに1つの特徴がある。

【0010】本発明の染色体解析方法によれば、(初期) 雑種胚を摘出し、直接異種染色体の動態を観察できる。植物の胚は一般に子房内部で存在するため、従来は切片を作製する等の必要があった。従来、観察が困難であった植物における雑種胚発生での異種染色体の動態を調べることができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の染色体解析方法は、切片を作製する必要がない点、押しつぶし法よりも空間的な位置情報が得られる点、多くの蛍光標識プローブを用いることが可能な点

などで、異種染色体の動態を効果的に解析するのに有利である。

【0011】本発明の染色体解析方法によれば、例えば、雑種胚における染色体の動態、雑种植物の組織における異種染色体の動態などを調べることができる。

【0012】本発明の染色体解析方法においては、まず、分析対象の雑種の植物個体由来の試料と、該試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液とを接触させることにより、該試料を固定して、固定試料を得る〔ステップ(a)という〕。

【0013】前記「植物個体」としては、コムギ、イネ、タバコを始めとする雑種が作出できる植物全般が挙げられる。

【0014】本明細書において、「雑種」とは、遠縁交雑あるいは近縁種間の交雑により生じた雑種であってもよい。

【0015】分析対象の雑種の植物個体由来の試料としては、例えば、胚、根端、成長点等の分生組織、減数分裂を行なう花粉母細胞などが挙げられる。

【0016】「試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液」としては、酢酸エタノール、メタノール、ホルマリン、パラホルムアルデヒド含有溶液などが挙げられる。なかでも、植物個体由来の試料内への標識プローブの浸透性を十分に得る観点から、酢酸エタノールが望ましい。

【0017】試料と、該試料中の核酸を固定しうる化合物を含有した溶液との接触時間、すなわち、試料の固定に要する時間としては、例えば、酢酸エタノールの場合、1週間前後、パラホルムアルデヒド含有溶液の場合、4℃で一晩等が挙げられる。

【0018】なお、前記ステップ(a)においては、必要に応じて、細胞壁の消化をさらに行なってもよい。

【0019】前記細胞壁の消化は、例えば、プロテイナーゼ、具体的には、プロテイナーゼK、セルラーゼ、ペクチナーゼ、界面活性剤(例えば、Tween 20)などによる処理により行なわれうる。

【0020】なお、本発明の方法は、例えば、遠縁交雑により生じた雑種の雑種胚に適用することにより、交雑不和合性の原因、その過程を調べることができる点で有利である。

【0021】ついで、前記ステップ(a)で得られた固定試料内に、該雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種由来の核酸を異なる標識物質により標識して得られた標識プローブが浸透されうる条件下、かつ、該標識プローブと、該試料中に存在する核酸とが特異的にアニーリングするに適した条件下に、前記標識プローブと前記ステップ(a)で得られた固定試料とのハイブリダイゼーションを行なう〔ステップ(b)という〕。

【0022】前記「(標識プローブと、)相補的な配列を有する核酸とが特異的にアニーリングするに適した条件」とは、例えば、特定の遺伝子をコードする核酸のセンス鎖とアンチセンス鎖とが、他の遺伝子をコードする核酸の鎖とは、アニーリングせず、対応する鎖とのみアニーリングする条件をいう。かかる条件は、例えば、モレキュラークローニング ア ラボラトリーマニュアル第2版〔ザンブルーから、コールドスプリングハーバールボラトリー発行、(1989)〕などに記載のハイブリダイゼーションの条件などを参照して適宜選択されうる。

【0023】前記標識プローブは、該雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種由来の核酸を異なる標識物質により標識して得られた標識プローブであり、前記核酸は、該雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種から、慣用の核酸(例えば、ゲノムDNA)の単離方法に従って単離されうる。また、前記核酸は、雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種に対して特異的な配列からなる核酸であってもよい。かかる核酸の長さは、ハイブリダイゼーションに適した長さであればよく、例えば、400~200塩基長が挙げられる。前記核酸は、ゲノム全体に存在する散在型反復配列であってもよい。

【0024】本明細書において、「雑種の植物個体にゲノムを提供していることが疑われる分析種」とは、雑種の植物個体の親であることが推定される個体を意味する。

【0025】前記標識物質としては、例えば、蛍光物質、FITCなどが挙げられる。測定における操作の容易性及び測定に要する時間の短縮化の観点から、蛍光物質が好ましい。前記標識物質としては、例えば、FITC、Cy3、テキサスレッド、Cy5、Cy7、ビオチン、ジゴキシゲニン、ULYSIS oregon Green 488 (Molecular Probe社製)などが挙げられる。

【0026】ステップ(b)におけるハイブリダイゼーションは、例えば、ゲノミックスituハイブリダイゼーションにおける手法などと同様に行なうことができる。例えば、被験試料を保持した支持体(スライドガラスなど)と、ハイブリダイゼーション液〔組成: 脱イオンホルムアルデヒド(ロッシュ製) 5 μ l、50% 硫化デキストラン 2 μ l、20 \times SSC (1 \times SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0を示す) 1 μ l、標識プローブ 0.5 μ l (0.1 μ g/ μ l)、ブロッキングDNA (コムギ \times トウモロコシのときはコムギのゲノムDNAをソニケートしたもの)〕とを、70℃で5分間インキュベートした後、37℃で一晩インキュベートし、得られたスライドガラスを、2 \times SSCにより、室温暗黒下で10分洗浄し、ついで、0.1% Triton X

100を含む2×SSCにより、室温暗黒下で10分洗浄し、その後、2×SSC室温暗黒下で10分により洗浄する条件などが挙げられる。

【0027】について、試料における染色体の動態を前記標識プローブのそれぞれの標識物質に由来するシグナルを介して観察する〔ステップ(c)という〕。

【0028】シグナルの検出は、慣用の共焦点レーザー顕微鏡、蛍光顕微鏡などにより行なわれうる。なお、前記蛍光顕微鏡は、2次元方向(x軸、y軸)に加え、z軸方向の画像を得るための装備を有することが望ましく、かかる装備を有するシステムとしては、例えば、デコンボリューション画像システムなどが挙げられる。

【0029】また、試料全体を、DAPI、PI、ヘキスト33258、YOYO1などにより、染色して、対比染色を行なってもよい。

【0030】本発明の染色体解析方法によれば、染色体の解析に際し、生体に近い状態を維持しているため、分析対象の雑種の植物個体における染色体の動態を、生体での形態を保持した状態で解析することができるという優れた効果を発揮する。

【0031】

【実施例】以下、実施例などにより本発明を詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

【0032】実施例1

雌親としてのコムギ系統は、パンコムギ品種Chinese Spring (CS)を用いた。花粉親としてのトウモロコシは、系統919Jを用いた。

【0033】除雄したコムギ雌しべにトウモロコシ花粉を交雑した。交雑24時間後(受精卵の第1分裂が起きている)に、固定液〔エタノール：酢酸＝3：1(体積比)〕に、コムギ雌しべを浸漬し、固定した。固定したコムギ雌しべを、45% 酢酸カーミン染色液中に浸漬し、一晚以上室温で静置することにより染色した。

【0034】について、実体顕微鏡下で、コムギ雌しべより胚珠を摘出した。さらに、実体顕微鏡下で、胚種内より胚(雑種胚)を、シランコートスライドガラス上に滴下した45%酢酸中で摘出した。ついで、そのまま、シランコートスライドガラスを乾燥させ、摘出胚とスライドガラスとを付着させた。

【0035】雑種胚を付着させたシランコートスライドガラスを用い、以下のように、ハイブリダイゼーションを行なった。

【0036】なお、核単離法により抽出したトウモロコシ核DNAを、ULYSIS oregon Green 488 (Molecular Probe社製)により、直接標識し、プローブとして用いた。すなわち、核単離法により抽出されたトウモロコシ核DNAを、ソニケートにより400～200bpに断片化した。得られた断片化核DNAを、ULYSIS Labelin

g System (Molecular Probe社製)のOregon Green 488により標識して、標識プローブDNAを得た。

【0037】スライド1枚あたり(22×22mmカバーガラスを用いた場合)、ハイブリダイゼーション液〔組成：脱イオンホルムアルデヒド(ロッシュ製)5μl、50%硫化デキストラン2μl、20×SSC 1μl、標識プローブDNA 0.5μl(0.1μg/μl)、ブロックングDNA(コムギ×トウモロコシのときはコムギのゲノムDNAをソニケートしたもの)〕

10μlを用いた。なお、前記ハイブリダイゼーション液の量は、試料の厚み、ハイブリダイゼーションを行なう面積により、上記の割合になるように適宜変更し、調製した。

【0038】調製したハイブリダイゼーション液を、沸騰水中で10分間インキュベートして、標識プローブDNAおよびブロックングDNAのそれぞれを変性させ、直ちに氷中に投じ10分間冷却することにより、それぞれを1本鎖DNAとした。

【0039】先に調製したスライドガラスは、70%脱イオンホルムアルデヒドを含む2×SSC中で、70℃2.5分間インキュベートした。ついで、インキュベート後のスライドガラスを、-20℃の70%エタノール、-20℃の90%エタノール、-20℃の100%エタノール中にそれぞれ5分ずつ浸漬し、その後、スライドガラスを室温で風乾した。

【0040】について、ハイブリダイゼーション液をスライドガラス上に滴下し、カバーガラスで封じたスライドを70℃で5分間処理した。2×SSC湿室中で、37℃一晚ハイブリダイゼーションを行なった。

【0041】ハイブリダイゼーション後、スライドガラスから、カバーガラスをはずし、スライドガラスを、2×SSCにより、室温暗黒下で10分洗浄し、ついで0.1% Triton X 100を含む2×SSCにより、室温暗黒下で10分洗浄し、その後、2×SSC室温暗黒下で10分により洗浄した。

【0042】なお、スライドガラスについて、1ng/μlのプロビジウムヨーダイド(PI)を含むベクタシールド〔商品名：Vectashield、ベクタ(Vecta)社製〕により、対比染色を行なった。

【0043】画像は、BioRad社の共焦点レーザー顕微鏡MRC1024およびLaserSharp Ver. 2.1Aにより得た。

【0044】図1に示すように、交雑後48時間の雑種胚では、すでにトウモロコシ染色体は、小核として脱落しており、コムギ核内にトウモロコシ染色体は存在していないことがわかった。

【0045】また、交雑後24時間の雑種胚で、交雑後の1回目の分裂中期から分裂後期にかけてのトウモロコシ染色体の動態を明瞭に観察することができた。トウモ

ロコシ染色体は、中期における赤道板への整列がコムギ染色体に比べて遅れていることが観察された。さらに、トウモロコシ染色体は分裂後期での両極への分配が遅れており、トウモロコシ染色体の分配が不完全であった。

【0046】この分裂過程での染色体配置の遅延がトウモロコシ染色体の脱落を招くものと推察された。

【0047】さらに、図1～図4に、各分裂段階における動態を詳細に示す。なお、かかる図は参考用写真として、別途提出する。

【0048】図1のパネルAに示すように、交雑後1回目の分裂中期において、コムギ側の染色体（赤色の蛍光）が、赤道板に整列していることがわかった。一方、トウモロコシ染色体（黄色の蛍光）は、完全に整列していないことがわかった。また、10本のトウモロコシ染色体（黄色の蛍光）が観察された。

【0049】図1のパネルB、図2及び図3に示すように、交雑後1回目の分裂後期において、比較的、分裂後期には、トウモロコシ染色体は、複製され、20本のトウモロコシ染色体が確認されるが、パラレルに存在しないことがわかった。一方、コムギ側の染色体は、両極に引っ張られていた。

【0050】図4に示すように、交雑後48時間を経て8細胞期になった初期胚におけるトウモロコシDNAは、小核としてコムギ核外に存在し、小核を形成し、消失するものと思われる。

【0051】以上のように、本発明の染色体解析方法に

より、従来、観察が困難であった植物における雑種胚発生過程である染色体の動態を調べることができた。

【0052】

【発明の効果】本発明の染色体解析方法によれば、従来、観察が困難であった植物における染色体の動態を調べることができるという優れた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

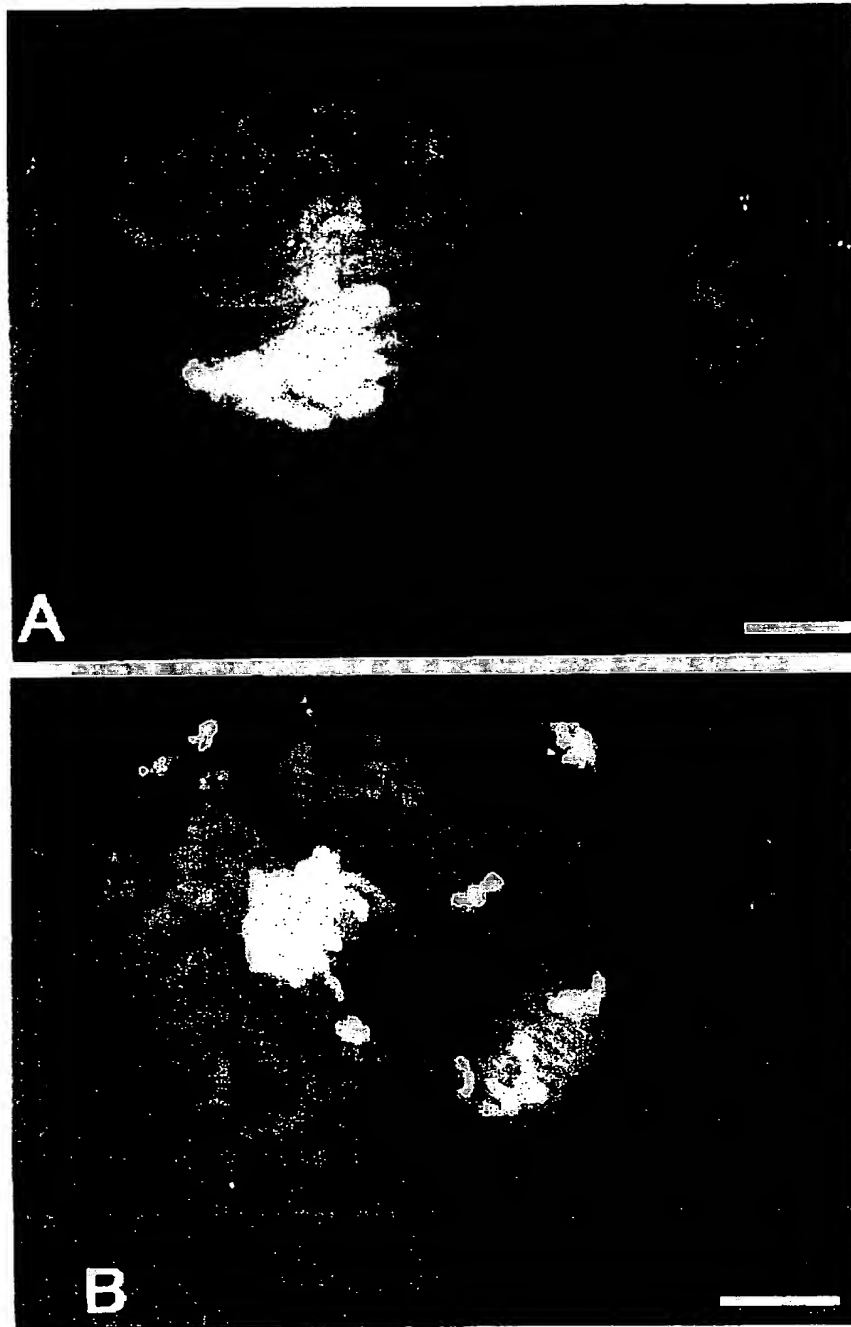
【図1】図1は、コムギ×トウモロコシ雑種胚におけるトウモロコシ染色体を検出した結果を示す図である。図中、パネルAは、交雑後1回目の分裂中期の雑種胚を示し、パネルBは、交雑後1回目の分裂後期の雑種胚を示す。図中、トウモロコシ染色体が濃く染色されている。スケールバーは、10 μ mを示す。

【図2】図2は、コムギ×トウモロコシ雑種胚について、交雑後1回目の分裂後期における染色体の動態を調べた結果を示す図である。図中、トウモロコシ染色体が濃く染色されている。スケールバーは、10 μ mを示す。

【図3】図3は、コムギ×トウモロコシ雑種胚について、交雑後1回目の分裂後期（図2よりも時間が経過した分裂後期）の染色体の動態を調べた結果を示す図である。スケールバーは、10 μ mを示す。

【図4】図4は、コムギ×トウモロコシ雑種胚について、交雑後48時間経過し、8細胞期になった初期胚における染色体の動態を調べた結果を示す図である。スケールバーは、10 μ mを示す。

【图 1】



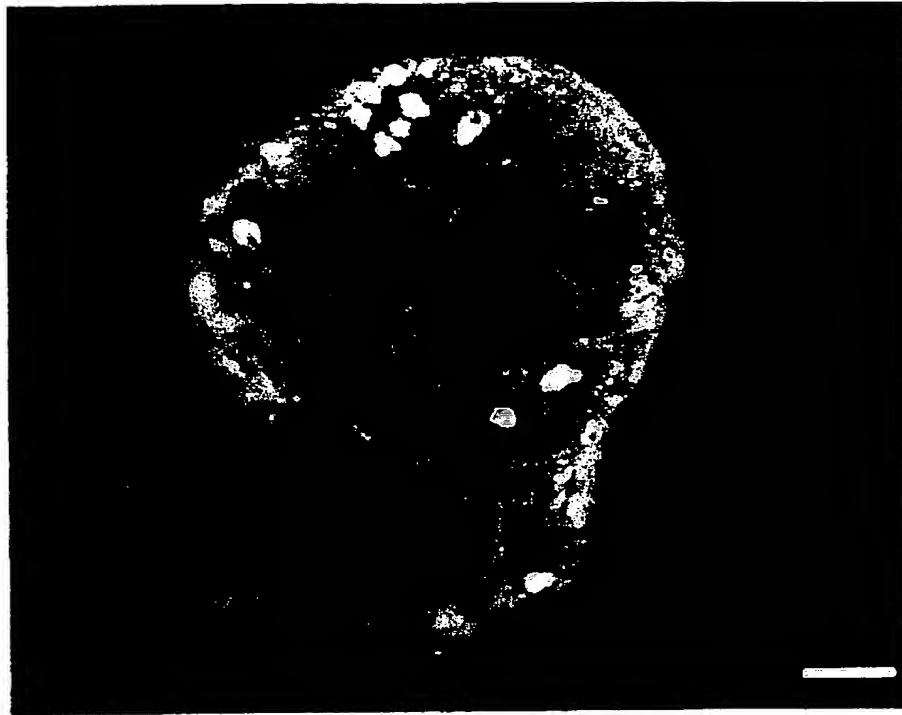
【图2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 村田 稔
岡山県倉敷市中央2-20-1 岡山大学資
源生物科学研究所内

Fターム(参考) 2B030 CA01 CA24
4B063 QA08 QA11 QQ09 QQ41 QR31
QR56 QR78 QS03 QS34 QX02